

PCT

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁷ : A61K 35/78	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 00/43023 (43) Fecha de publicación internacional: 27 de Julio de 2000 (27.07.00)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES00/00026 (22) Fecha de la presentación internacional: 21 de Enero de 2000 (21.01.00) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9900182 25 de Enero de 1999 (25.01.99) ES (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS CENTRUM, S.A. [ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): QUINTANILLA ALMA-GRO, Eliseo [ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES). DIAZ ALPERI, Joaquín [ES/ES]; Sagitario, 14, E-03006 Alicante (ES). (74) Mandatario: SEMPERE MASSA, Iván, Luís; Bazán, 20, 6º, Ofic. 606, E-03001 Alicante (ES).		(81) Estados designados: JP, US. Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i>
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION WITH ADHESION MOLECULE EXPRESSION REGULATING ACTIVITY (54) Título: UNA COMPOSICION FARMACEUTICA CON ACTIVIDAD REGULADORA DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS DE ADHESION (57) Abstract <p>The invention relates to a novel pharmacological application of a pharmaceutical composition exhibiting regulating activity of the expression of adhesion molecules integrins, selectins and immunoglobulins and its application as anti-inflammatory agent. Said pharmaceutical composition contains Anapsos, a water-soluble extract and a lipo-soluble extract of the rhizomes of Polypodium leucotomos as active substance in addition to acceptable excipients.</p> (57) Resumen <p>Una nueva aplicación farmacológica de una composición farmacéutica con actividad reguladora de la expresión de las moléculas de adhesión, integrinas, selectinas e inmunoglobulinas y su aplicación como agente antiinflamatorio. Esta composición farmacéutica contiene como principio activo el Anapsos un extracto hidrosoluble y un extracto liposoluble de los rizomas de Polypodium leucotomos, junto a excipientes aceptables.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungria	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Niger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	PL	Polonia	ZW	Zimbabue
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PT	Portugal		
CM	Camerún	KR	República de Corea	RO	Rumania		
CN	China	KZ	Kazakstán	RU	Federación de Rusia		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	SD	Sudán		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SE	Suecia		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
DK	Dinamarca	LR	Liberia				
EE	Estonia						

5 TÍTULO DE LA INVENCIÓN

Una composición farmacéutica con actividad reguladora de la expresión de las moléculas de adhesión.

10 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un nuevo uso farmacológico del Anapsos, un extracto natural del *Polypodium Leucotomos* compuesto por 118 miligramos de extracto hidrosoluble y 2 mg de fracción liposoluble.

15

La presente invención describe la acción del Anapsos en la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión, reduciendo la expresión de la cadena alfa de la integrina β -2 (CD11a y CD11b), la cadena beta de la integrina β -2 (CD18), el marcador CD54 de la superfamilia de las inmunoglobulinas, reduciendo la expresión espontánea de los antígenos de diferenciación CD11b y CD-62L tras la estimulación de células tumorales mieloides HL60 y 937 y normalizando las alteraciones del fenotipo inmunológico así como su utilización en cualquiera de las enfermedades en las que un exceso de inflamación sea responsable de los síntomas y signos derivados de la lesión celular y tisular que acontece en dichas patologías.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCION.

El sistema inmune es el responsable de la protección en los animales de los invasores extraños, tales como bacterias y virus. La capacidad del sistema inmune para efectuar su función
10 depende en gran medida de la presencia y función de los leucocitos.

La capacidad de los leucocitos para proteger a animales o humanos se ha encontrado que requiere la adhesión de las células del sistema inmune a los sustratos celulares o extracelulares. Por ejemplo, los leucocitos deben ser capaces de unirse a las células endoteliales
15 y así poder migrar desde el torrente sanguíneo al núcleo inflamatorio. Además, los leucocitos deben unirse a los antígenos para que la respuesta inmune pueda ocurrir, de la misma manera deben unirse a células dianas para que la lisis de las células infectadas por virus o tumores pueda ocurrir. De la misma manera, los leucocitos pueden ser capaces de unirse a varias proteínas activadas (ic3b) para efectuarse correctamente la fagocitosis y actividad antimicrobiana. La
20 adhesión de los leucocitos está involucrada en la inhibición del sistema de defensa. Por lo tanto el proceso de adhesión está involucrado en la lucha contra la infección o la supresión de la capacidad o rechazar los tejidos transplantados.

Para que las células del sistema inmune puedan realizar eficazmente su función requieren
25 mantener contactos con otras células o con la matriz extracelular, reconociendo la situación de su entorno. Por ello los leucocitos no sólo poseen en su superficie receptores específicos y que pueden activarse de forma específica en respuesta a determinados estímulos, sino que también expresa una serie de moléculas que se engloban bajo la denominación de moléculas de adhesión. Estas moléculas leucocitarias van a actuar como receptores de ligandos que están ubicados en

5 otras células, actuando en este caso como contrarreceptores de secuencias de aminoácidos presentes en diferentes proteínas de la matriz celular, como el colágeno, la fibronectina, la láminina y otras. Las moléculas de adhesión además de permitir o favorecer la unión célula-célula o célula-matriz extracelular, colaboran en la activación celular enviando señales coactivadoras al interior de la célula.

10

La migración de leucocitos a los tejidos, tiene lugar a través de una serie de interacciones moleculares, entre las cuales las moléculas de adhesión juegan un papel fundamental, según su estructura las moléculas de adhesión pueden clasificarse en 3 grandes categorías:

15

- Las selectinas
- Las que pertenecen a la familia de las integrinas
- Las que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas

20

La primera etapa en el fenómeno inflamatorio es el rodamiento de los leucocitos sobre la pared endotelial, que da lugar a la marginación de los mismos. Este proceso inicial de marginación, está mediado por la interacción entre determinadas selectinas de endotelio (selectina E y P) y su contra- receptor en el leucocito (sLex) y entre la selectina L del leucocito y determinadas adhesiones del endotelio. A su vez, se induce la expresión de las moléculas de adhesión junto a la liberación de las citocinas proinflamatorias. A continuación, una señal de

25 activación induce un cambio conformacional en los dominios extracelulares de las integrinas leucocitarias, dando lugar a una adhesión más firme, mediada por interacciones entre determinadas integrinas y sus ligandos (LFA-1/ICAM-1, VLA-4/VCAM-1). Como consecuencia de la adhesión leucocito/endotelio, se detiene el rodamiento de los leucocitos y se produce la extravasación y salida de los leucocitos desde el torrente sanguíneo al foco inflamatorio, por

5 quimiotaxis. Las integrinas pues, son moléculas responsables de diferentes procesos de adhesión, mediando la adhesión definitiva al endotelio, la extravasación y la migración hacia los focos inflamatorios, así como la activación de las células T autorreactivas para atravesar la barrera hematoencefálica (BHT).

10 Las cadenas alfa y beta de la integrina β -2 (CD11a, CD11b, CD18) están ampliamente extendidas en todos los tejidos por lo que una disminución de su expresión conlleva un efecto antiinflamatorio en estos tejidos. La molécula de adhesión CD54 perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas se encuentra del mismo modo ampliamente distribuida por diversos tejidos tales como endotelio, leucocitos etc.

15

En pacientes con esclerosis múltiple se ha observado un aumento de la población linfocitaria CD4+CD29+CD45RA, así los últimos datos de la literatura sobre células naïve y de memoria, apoyan un papel fundamental de las células "CD4+CD29+CD45RA+revertant" como las auténticas células de memoria, con vida media más larga que las CD45RO+ y capaces una vez

20 sensibilizadas de permanecer años en el organismo

La inflamación, si bien suele ser un proceso fisiológico, cuando es llevado a un extremo puede convertirse en algo patológico. Esto es lo que ocurre por ejemplo en la mayor parte de los procesos autoinmunes (sistémicas u organoespecíficas), enfermedades inflamatorias crónicas e
25 infecciosas cuyos síntomas vienen marcados por una inflamación exagerada que es responsable del daño originado a órganos y tejidos. Así cualquier fármaco que sea capaz de regular la expresión de moléculas de adhesión en los procesos en los que habitualmente hay un aumento de expresión de las mismas, puede ser útil en el tratamiento de estos, sea cual sea su etiopatogenia: trastornos neurodegenerativos (esclerosis múltiple, Alzheimer), enfermedades del

5 tejido conectivo (lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide), enfermedad de Behçet. etc.). iniciando la respuesta inmune y activando la extravación y migración de los leucocitos al foco inflamatorio o su uso como coadyuvante junto a otros agentes antiinflamatorios, inmunosupresores y/o inmunomoduladores. Además un fármaco capaz de regular la expresión de las moléculas de adhesión hace que el sistema inmune efectúe su función.

10

La acción antiinflamatoria debido a reducción de la expresión de las moléculas de adhesión se ejerce de forma independiente a la inhibición-estimulación de las citocinas inflamatorias y al efecto estimulante sobre la inmunidad celular (incremento de las citocinas TH1-like e incremento de linfocitos T CD8+ y células NK).

15

Los extractos del género de las Polipodáceas han sido utilizados tradicionalmente en Centro América en la medicina popular atribuyéndoles diferentes actividades tales como: actividad antiinflamatoria, **Boletín de la Sociedad Química del Perú pag. 91 (1988)**; prevención de tumores malignos, **Nature 214: 1256-1258 (1967)**. Se han descrito efectos clínicos en enfermedades relacionadas con los déficit inmunológicos, tales como dermatitis atópica; **Dermatológica 173: 154-156 (1986)**; dermatitis atópica, **Allergology et Immunopathology 15: 185-189 (1987)**; **International Journal of Dermatology 13: 276-282 (1974)**; **Planta Médica 58: 306-310 (1992)** y vitiligo, **International Journal of Dermatology 28: 479 (1989)**. En estas publicaciones se ha encontrado que los extractos de *Polypodium leucotomos* han tenido acción en la hiperqueratosis, paraqueratosis, mitosis epidérmica y lesiones de la epidermis.

25

Los extractos de estos helechos han tenido capacidad inmunomoduladora en pacientes con dermatitis atópica, con una normalización de la relación CD4+/CD8+ después de tratamiento de extracto de *Polypodium leucotomos* (Anapsos®), **Dermatológica 173: 154-56 (1986)**; **Annals**

- 5 *Inmulogie* 134: 393-400 (1983). *Annals of Psychiatry* 3: 329-341 (1992) describen que el Anapsos[®] mejora el aprendizaje, disminuye los niveles de citocinas IL-1 β -2 y IL-2 en la corteza frontoparietal, disminuye la IL-1 β en el hipocampo, *Br. J. Clin. Pharmacol* 43: 85-89 (1997) describe el efecto inmunomodulador in vitro del extracto polar del *Polypodium leucotomos* (Anapsos[®]) sobre las citocinas IL-1 β -IL-2-IL-10-INF- γ lo cual podría tener un efecto pleiotrópico
- 10 en las diferentes poblaciones del sistema inmune.

Respecto a la literatura de patentes se han recuperado los documentos que a continuación se referencian.

- 15 La solicitud de patente europea **EP-0503.208** describe un procedimiento para la obtención de un extracto hidrosoluble por extracción de las hojas y/o rizomas de diversos helechos. Este documento especifica que dichos extractos presentan actividad inmunológica y así son de utilidad en las enfermedades con una depresión del sistema inmune generalmente con un déficit de linfocitos T supresores y con efectos beneficiosos en las enfermedades autoinmunes e infecciones
- 20 virales y su utilización en patologías tales como: Artritis reumatoide, lupus eritematoso, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, hepatitis B, síndrome de Di George, anemia autohemolítica, dermatitis atópica, psoriasis, enfermedad de Basedow, enfermedad de Chron, mistenia, vitiligo, herpes zoster etc., aumentándose los linfocitos T supresores.
- 25 La patente española **ES-2.088.770** nos enseñan una composición farmacéutica basada en una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble de las hojas y/o los rizomas de diversos helechos con efectos beneficiosos en las disfunciones cognitivas, y/o neuroinmunes, especialmente en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

5 La patente **US-5.614.197** describe la utilización de los extractos de *Polypodium* como agentes fotoprotectores y antioxidante. La patente española **ES-470.204** se refiere a la obtención de terpenos naturales con actividad antipsoriática obtenidos por la extracción de los rizomas y hojas de diversos helechos. La patente española **ES-490.293** se refiere a un medicamento con efectos antiinflamatorios en problemas patológicos que afecten al aparato osteolocomotor del
10 organismo humano, especialmente las artritis, a partir de extractos de helechos de la familia Polypodaceae utilizando tanto sus hojas como sus rizomas.

 La patente **US-3.839.553** usa los extractos de *Polypodium* como acondicionadores capilares. La patente francesa **FR-2.395.266** está relacionada con la obtención de una α -d-glucioctano-delta-lactona-eno-diol y su sal cálcica a partir de los helechos de *Polypodium*, teniendo
15 actividad como agente inmunosupresor y antiviral en mamíferos.

 La solicitud de patente con número de publicación **WO-97/40838** detalla la utilización de un sulfolípidos en el tratamiento de los trastornos inflamatorios de la piel, especialmente en la psoriasis mediante la inhibición del factor de agregación plaquetaria siendo obtenido el
20 sulfolípidos a partir de las hojas por extracción con metanol.

 Los extractos de *Polypodium* descritos en el Estado de la técnica son extractos hidrosolubles o hidrofílicos los cuales pueden obtenerse por extracción con disolventes polares
25 seguidos de diferentes pasos de purificación como purificación por resinas intercambiadoras de iones, adsorción sobre carbón activo y posterior evaporación del disolvente o liofilización. Así mismo las fracciones lipídicas o liposolubles se pueden obtener por extracción con disolventes apolares tales como hexano, cloroformo, éter, obteniéndose los diferentes triterpenos presentes en las hojas y/o rizomas. La composición farmacéutica de esta invención contiene como principio

5 activo el extracto de Polypodium, Anapsos, siendo esta composición farmacéutica la descrita en la patente española **ES-2.088.770**, compuesta por una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble y vehículos farmacéuticos aceptables, conteniendo cada dosis unitaria 120 mg de extracto que corresponde a 118 mg de fracción hidrosoluble, equivalente a 60 mg de extracto alcohólico y 2 mg de fracción liposoluble.

10

Los excipientes utilizados son de uso habitual en la industria farmacéutica, siendo en esta preparación lactosa, almidón, estearato de magnesio y dióxido de silicio, pudiéndose emplear otros excipientes y en otras proporciones.

15

El extracto hidrosoluble se obtiene por maceración en agua durante 24-48 horas de los rizomas y hojas de los helechos Polypodium aureum, Polypodium leucotomos, Polypodium vulgare, Polypodium trisereiale, Pteridium aquilinum, Dryopteris crassirhizoma y Cyathea taiwaniana; caracterizándose dicha fracción hidrosoluble por la presencia de ácido quínico, ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fumárico y por la ausencia de cualquier sulfolípido.

20

La fracción liposoluble está caracterizada por la presencia de Neohop-13(18)-eno, Fern-9-(11)-eno y Hop-(22)-29-eno identificados mediante espectrometría de masas.

25

En los documentos que componen el Estado de la Técnica se describen distintas actividades, a veces de una forma empírica sin detallar el mecanismo, de los extractos polares y apolares de los rizomas y/o hojas de los helechos pertenecientes a la familia de las Polipodáceas.

Las acciones farmacológicas se podrían resumir en:

- 5 - Actividad inmunomoduladora en las enfermedades con déficit de linfocitos T, supresores, infecciosas y autoinmunes. mostrando los extractos efecto pleiotrópico sobre las distintas poblaciones de citocinas.
- Actividad colagenopoyética y aplicación en psoriasis, dermatitis atópica.
- Actividad antiinflamatoria del aparato osteolocomotor, principalmente la artritis.
- 10 - Actividad antiinflamatoria caracterizada por la inhibición del factor de agregación plaquetaria.

 En ningún documento recuperado se ha demostrado la acción de los extractos de los diferentes helechos sobre la regulación de las moléculas de adhesión, que son las responsables del inicio de las respuesta inmune, ni sobre las poblaciones linfocitarias CD4+CD29+CD45RA+ que se hayan aumentadas en los pacientes múltiples.

15

OBJETIVO DE LA INVENCION

20 La presente invención desarrolla una nueva aplicación terapéutica del Anapsos basada en la regulación de los distintos mediadores celulares. La regulación de la expresión de las moléculas de adhesión (la disminución de expresión de las cadenas de integrinas , de la superfamilia de las inmunoglobulinas y de las selectinas) y la normalización de la población linfocitaria CD4+CD29+CD45 RA+, hace del Anapsos un fármaco adecuado por cualquier

25 enfermedad es inflamatorias autoinmunes sistémicas y/o organoespecíficas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

El Anapsos (118 miligramos de extracto hidrosoluble y 2 miligramos de la fracción liposoluble de *Polypodium*) ha mostrado un efecto regulador sobre la expresión de las moléculas de adhesión, en las células mononucleares, de sangre periférica de humanos sanos, tanto in vivo como in vitro. El Anapsos ha demostrado una capacidad similar a la azatioprina para revertir a normalidad la población linfocitaria CD4+CD29+CD45RA+ que se halla aumentada en los pacientes con esclerosis múltiple observándose una estabilización de los pacientes.

A dosis entre 0 - 5000 µg/ml de Anapsos y utilizando diferentes dosis de fitohemaglutinina, el Anapsos es capaz de inhibir el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión (CD54 y CD11b) inducido por la fitohematoglutinina en estudios realizados sobre células mononucleares de sangre periférica en humanos, siendo los resultados más significativos a dosis de 150 µg/ml de Anapsos y 10 µg/ml de fitohemaglutinina.

La estimulación de células de las líneas tumorales mieloides HL-60 y U-937 con lipopolisacáridos bacterianos (LPS), mostró una disminución de los antígenos de diferenciación de CD11b y CD62-L tras la administración de Anapsos a las 24 horas y 48 horas volviéndose a los valores iniciales, antes de la estimulación.

Tras la administración de 720 miligramos de extracto por día durante 11 días en humanos, el Anapsos disminuyó el porcentaje de las poblaciones linfoides CD11a, CD11b y CD54. El extracto por tanto inhibe la expresión de determinadas moléculas de adhesión de las inmunoglobulinas (CD 54).

5 Asi, aparte de la acción estimulante sobre la Inmunidad celular ejercida por las citocinas y su acción inmunomoduladora descritas por el Estado de la Técnica, el Anapsos posee una fuerte capacidad antiinflamatoria, similar a la fenilbutazona, utilizada como control en estudios de actividad antiinflamatoria en ratones, no estando relacionados directamente la regulación de las moléculas de adhesión con sus efectos antiinflamatorios.

10

En estudios clínicos realizados en humanos la composición farmacéutica a base de extractos hidrosolubles y liposolubles de *Polypodium* ha mostrado ser eficaz en algunas enfermedades en las que existe un proceso inflamatorio por ejemplo esclerosis múltiple, prostatitis, faringitis, teniendo estas enfermedades una etiopatogenia diferente entre sí.

15

La invención se describe ahora por medio de los ejemplos siguientes, no siendo limitativos del alcance de la invención. **Ejemplo 1. - Estudio de la capacidad antiinflamatoria**

Material.-

- | | | |
|----|---|--|
| 20 | - | Ratas WISTAR hembras de 150 ± 15 g |
| | - | Pletismómetro LETICA |
| | - | Balanza METTLER AJ 100 |
| | - | Balanza COBOS D 600 |
| | - | Fenilbutazona |
| 25 | - | DIFCO |
| | - | CMC y Tween 80 |

5 Método.-

Se ha llevado a cabo un estudio de la actividad antiinflamatoria, en fase aguda y crónica, siguiendo el método descrito por Mizushima en ratas. El fármaco de referencia (fenilbutazona, dosis de 80 mg/Kg) y los productos problema (a dosis equivalentes a 1,25 g de extracto por Kg de peso de animal) son disueltos en una solución al 1% de CMC (carboximetilcelulosa) en agua destilada (p/v) y Tween 80: agua destilada (0,2: 3,3 – v/v), para su administración por vía oral.

Seis días después de la inoculación, por vía intradérmica de 0,1 mL del adyuvante completo de Freund (DIFCO) en la parte basal de la cola, se inyectan 0,1 mL de una suspensión de carragenina tipo IV al 2% (p/v) en la aponeurosis plantar de la pata posterior izquierda.

15

El volumen de la pata del animal se realiza inmediatamente antes de la inyección de carragenina (volumen basal) y posteriormente a las 3, 5 y 7 horas (fase aguda de la inflamación) y a las 24, 48, 72 y 96 horas (fase crónica de la inflamación), mediante un pletismómetro de agua.

Los productos en estudio, la fenilbutazona y el vehículo se administran, por vía oral, a lotes de 6 animales, 1 hora antes de la inyección de carragenina y a las 24, 48 y 72 horas.

Resultados.-

El porcentaje de inhibición de la inflamación se calcula comparando el incremento de volumen de la pata del animal con respecto a su volumen basal, para cada grupo de animales en relación con el grupo control, al que se ha administrado el vehículo de la fenilbutazona y los productos en estudio. La significación estadística es evaluada mediante el test de la T de Student, los resultados obtenidos se detallan a continuación.

% INHIBICIÓN DE LA INFLAMACION							
	3 h	5 h	7 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	---	---	---	---	---	---	---
Fenilbutazona	41%	27%	21%	36%	60%	56%	40%
Anapsos	29%	35%	41%	43%	50%	54%	48%

Los resultados muestran que el extracto de *Polypodium* manifiesta una actividad inhibitoria del proceso de inflamación, superando al control en la fase aguda de inflamación y
 10 teniendo una actividad similar a la fenilbutazona en la fase aguda.

Ejemplo 2. - Estudios clínicos sobre la respuesta del Anapsos en diferentes patologías:

- Esclerosis múltiple: En un estudio realizado en pacientes con esclerosis múltiple, a lo largo de
 15 un año de tratamiento con 720 mg de extracto/día, resultó útil para corregir las alteraciones del fenotipo inmunológico más característico de esta enfermedad, coincidiendo a la vez con una estabilización clínica de los pacientes y regulándose la población linfocitaria CD4+CD29+CD45RA+.
- Prostatitis. Tras tres días de tratamiento con dosis de 240 mg de extracto, 60 minutos antes de
 20 las comidas principales, se observa una mejoría en los pacientes desapareciendo todos los síntomas.
- Faringitis. Con dosis de 120 mg de extracto muestra efectos favorables en los problemas faríngeos, especialmente en faringitis en periodo subagudo.

5 **Ejemplo 3. - Estudio in vitro de las moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica. PBMNc.**

Se extrajo sangre periférica de 10 individuos sanos y se separaron las células mononucleares mediante centrifugación por gradientes de densidad con Fycoll-Hypaque. Las
10 células se cultivaron en placas microtiter de fondo plano, a razón de 1 millón/ml durante 48 horas en estufa de CO₂, con fitohemaglutinina (PHA) a las concentraciones de 0, 0.5, 2, 5 y 10 µg/ml y /o con Anapsos concentraciones entre 0 y 5000 µg/ ml. Finalizado el cultivo, los linfocitos se analizaron por citometría de flujo; se estudió la expresión de determinadas moléculas de adhesión (CD11a, CD11b, CD18, CD54) para las diferentes condiciones de estimulación. En
15 paralelo con el cultivo anterior, se realizó un cultivo de 5 días de duración y en las mismas condiciones de estimulación. Dieciséis horas antes de finalizar el cultivo, se añadió timidina tritada. Terminado el cultivo se lavaron las células con el Harvester y se les incorporó el líquido de centelleo. La incorporación celular de timidina tritada se valoró mediante un contador β. Durante el cultivo, se fotografiaron las células mediante un microscopio invertido. Los resultados
20 se muestran a continuación.

5

Expresión in vitro de distintas moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica.

	N= 10	CD11a	CD11b	CD18	CD54
10	PHA10	22%	35%	27%	9%
	ANP 150	15%	14%	19%	0%
	PHA+ANP	16%	23%	25%	3%
	CONTROL	17%	20%	20%	2%

15 **Ejemplo 4.- Expresión in vivo de las moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre periférica. PBMNc.**

Un total de 10 personas voluntarias sanas tomaron durante 11 días consecutivos 720 mg/día de Anapsos. A todos ellos se les extrajo periférica el día anterior de comenzar la
 20 medicación, al día siguiente del inicio, al cuarto día y tras la última toma. Se separaron las células mononucleares mediante centrifugación por gradientes de densidad con Fycoll-Hypaque, y se analizaron distintas poblaciones linfoides de acuerdo con la expresión o no de los siguientes marcadores de diferenciación CD11a y CD11b. Los resultados son los siguientes:

Expresión in vivo de las moléculas de adhesión en células mononucleares en sangre
 25 periférica. PBMNc.

N= 10	PRE	24H	72H	96H	RETIRADA
CD11b	13%	4%	2%	1%	12%
CD11a	14%	6%	3%	1%	15%

5 REIVINDICACIONES

- 1.- Utilización del Anapsos, un extracto natural aislado de los rizomas de *Polypodium*, compuesto por una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble junto a un vehículo farmacéutico aceptable para la fabricación de una composición farmacéutica reguladora de la expresión de las moléculas de adhesión.
- 2.- Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 donde la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión está caracterizada por la reducción de la expresión de las cadenas alfa de la integrina β -2 y/o las cadenas beta de la integrina β -2.
- 3.- Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 donde la regulación de la expresión de la molécula de adhesión está caracterizada por la reducción de la expresión del CD54.
- 4.- Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 donde la expresión de las moléculas de adhesión está caracterizada por la disminución en los antígenos de diferenciación CD11b y/o CD62L.
- 5.- Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 1 como agente antiinflamatorio y inmunomodulador caracterizado por su capacidad reductora de la expresión de las moléculas de adhesión.
- 6.- Utilización del Anapsos, un extracto natural aislado de los rizomas de *Polypodium* compuesto por una fracción hidrosoluble y una fracción liposoluble junto a un vehículo farmacéuticamente

- 5 aceptable para la fabricación de una composición farmacéutica para normalizar las poblaciones linfocitarias CD4+CD29+CD45RA+ en las patologías con dicha población aumentada.

7.- Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 6 donde la patología es la esclerosis múltiple.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 00/00026

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 : A61K 35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 : A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NAPRALERT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	BERND, A. et al. In vitro studies on the Immunomodulating effects of Polypodium leucotomos extract on human leucocyte fractions. Arzneimittel-Forschung, 1995. Vol. 45, n° 8, pages 901-904	1,5,6
A	WO 9807432 A1 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION) 26 February 1998 (26.02.98), page 2, lines 19-26, page 3, lines 5-8	1,2,5,7
A	SEMPERE, J.M. et al. Effect of Anapsos (Polypodium leucotomos extract) on in vitro production of cytokines. Br. J. Clin. Pharmacol., 1997. Vol. 43, n° 1, pages 85-89	1,5
A	EP 0503208 A1 (MARACUYAMA INTERNATIONAL, S.A.) 16 September 1992 (16.09.92), page 1	5,6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2000 (12.04.00)

Date of mailing of the international search report

19 April 2000 (19.04.00)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

Facsimile No

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES 00/00026

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	RAYWARD, J. et al. An extract of the fern Polypodium leucotomos inhibits human peripheral blood mononuclear cells proliferation in vitro. Int. J. Immunopharmacol, 1997. Vol. 19, n° 1, pages 9-14	5,6

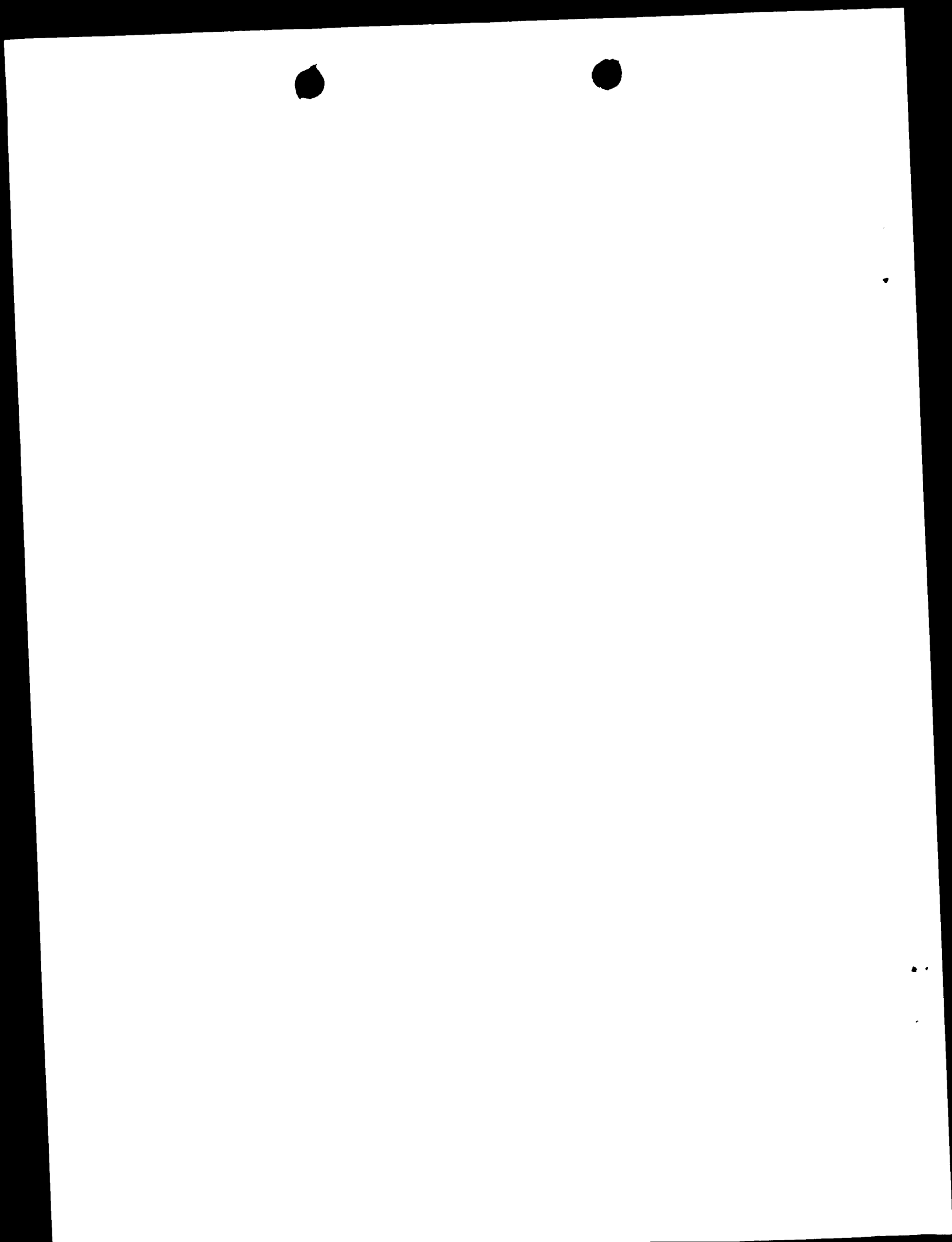
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 00/00026

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0503208 A1	16.09.1992	NONE	



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 00/00026

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 35/78

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NAPRALERT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	BERND, A. et al. In vitro studies on the Immunomodulating effects of Polypodium leucotomos extract on human leucocyte fractions. Arzneimittel-Forschung, 1995. Vol. 45, n° 8, páginas 901-904	1,5,6
A	WO 9807432 A1 (AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION) 26.02.1998. Página 2, líneas 19-26, página 3, línea 5-8	1,2,5,7
A	SEMPERE, J.M. et al. Effect of Anapsos (Polypodium leucotomos extract) on in vitro production of cytokines. Br. J. Clin. Pharmacol., 1997. Vol. 43, n° 1, páginas 85-89	1,5
A	EP 0503208 A1 (MARACUYAMA INTERNATIONAL, S.A.) 16.09.1992, página 1	5,6

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 12 abril 2000 (12.04.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

19 ABR 2000

19. 04. 00

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panama 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

ASHA SUKHWANI

n° de teléfono + 34 1 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES00/00026

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	RAYWARD, J. et al. An extract of the fern Polypodium leucotomos inhibits human peripheral blood mononuclear cells proliferation in vitro. Int. J. Immunopharmacol, 1997. Vol. 19, nº 1, páginas 9-14	5,6

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 00/00026

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0503208 A1	16.09.1992	NINGUNO	

